10.22092/sppi.2022.359421.1265

"مجله نهال و بذر"
جلد ۳۷، شماره ۴، سال ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پایه های بذری درگزی و رویشی پیرودوارف گلابی به کاربرد ملاتونین در شرایط تنش خشکی

Physiological and Biochemical Responses of Dargazi Seedling and Pyrodwarf Clonal Pear Rootstocks to Melatonin Application under Drought Stress Conditions

مرتضی ابتدایی[۱]، کاظم ارزانی[۲] و حمید عبداللهی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۱۱/۱۲

چکیده

ابتدایی، م.، ارزانی، ک. و عبداللهی، ح. ۱۴۰۰. پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پایه های بذری درگزی و رویشی پیرودوارف گلابی به کاربرد ملاتونین در شرایط تنش خشکی. **مجله نهال و بذر ۳۷:** ۴۷۰-۴۵۳.

در این پژوهش کارایی ماده ملاتونین برای کاهش آثار سوء تنش خشکی بر روی دو پایه تجاری گلابی(پایه بذری درگزی و پایه رویشی پیرودوارف) ارزیابی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به مدت یک سال در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس در تهران انجام شد. برای این منظور ۱۰ روز قبل از اعمال تنش خشکی ماده ملاتونین با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار در محیط ریشه گیاهان استفاده شد. عوامل آزمایشی شامل: پایه در دوسطح (پایه بذری درگزی و پایه رویشی پیرودوارف)، ملاتونین در دوسطح (بدون ملاتونین و غلظت ۱۰۰ میکرو مولار ملاتونین)، تنش خشکی در دوسطح (آبیاری هر ۱۰ روز یکبار و قطع آبیاری به مدت ۴۰ روز) و طول دوره (زمان) تنش خشکی در چهار سطح (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از اعمال تنش خشکی). نتایج نشان داد که ملاتونین اثر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II و کاهش اثر تنش خشکی درهر دو پایه داشت. با افزایش دوره تنش خشکی میزان کلروفیل در پایه‌هایی که با ملاتونین تیمار شده بودند کمتر دچار تخریب شد . اثر متقابل زمان × تنش خشکی، تنش خشکی × ملاتونین و ملاتونین × زمان بر صفات مورد بررسی در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار شد. تیمار با ملاتونین به طور معنی‌داری مانع از نشت یونی شد و باعث افزایش پایداری غشاء سلول در هر دو پایه بذری درگزی و رویشی پیرودوارف شد. همچنین پیش تیمار ملاتونین باعث افزایش فنل کل در هر دو پایه شد و تحمل گیاه را به تنش خشکی بهبود بخشید. میزان افزایش تولید فنل کل در گیاهان تحت تنش خشکی شدید در مقایسه با شاهد در پایه بذری درگزی و رویشی پیرودوارف به ترتیب ۱۲۳ و ۱۰۰ درصد بود. کاربرد ملاتونین به جذب بیشتر عناصر سدیم، پتاسیم و فسفر در شرایط تنش خشکی نیزکمک نمود.

واژه‌های کلیدی: گلابی، نگه داشت آب، حداکثرکارایی کوانتومی فتوسیستم II ، پایداری غشاء، فنل کل.

نگارنده مسئول: arzani_k@modares.ac.ir تلفن: ۰۲۱۴۸۲۹۲۰۹۴

مقدمه

گلابـی (*Pyrus communis* L.) یـک محصول مهم و پرطرفداراز خـانواده گلسـرخیان است که بیشـترمناطق معتـدل کشـورهای آسـیا، اروپا، آمریکا شـمالی و جنـوبی و اسـترالیا بـرای ارزش اقتصـادی و غـذایی آن کاشـته مـی‌شـود. براسـاس آخـرین آمارهـای سـازمان خواربـار و کشاورزی ملل متحد، سطح زیر کشـت درخـت گلابـی در جهـان در سـال ۲۰۲۰ حـدود ۲،۱۶۲،۰۰۰ هکتار و تولید آن حدود ۴۰ میلیـون تن بـرآورد شـده اسـت (FAO, 2020). گلابـی یکی از مهم‌ترین میوه‌های تـازه‌خوری در ایـران می‌باشـد کـه در صـنعت میوه‌کـاری ایـران از جایگـاه و اهمیـت خاصـی برخـوردار اسـت. بـر اسـاس آمارنامـه کشـاورزی بـرای محصـولات باغبانی در سال ۱۳۹۹ ، سطح زیر کشت و تولید انواع گلابـی در ایـران بـه ترتیـب ۱۹،۸۶۳ هـزار هکتار و تولید آن ۲۱۰،۷۰۵ تن بگـزارش شـده است (Ahmadi *et al.*, 2020).

تنش خشـکی یکـی از عوامـل مهـم محـدود کننـده تولیـد در بخـش کشـاورزی در سراسـر جهان است (Adnan, 2020) که صنعت کشـت و پرورش درختان میوه و تولید آنها را نیز تحـت تـاثیر قـرار داده اسـت (Arzani, 2017). تـنش خشـکی تـأثیرات درازمـدت بـر منـابع آب، تولیدات کشـاورزی و فعالیـت‌هـای اقتصـادی و اجتمـاعی دارد. در منـابع مختلـف، تعـاریف گوناگونی از خشکسالی ارائه شـده اسـت. تـنش خشـکی بـه عنـوان یکـی از مهم‌تـرین عوامـل محیطی موثر بر بقـای ژرم پلاسـم درختـان میـوه شـناخته مـی‌شـود (Arzani, 2017). گیاهـان بـه طور کلی ساز کارهای متفاوتی برای سـازگاری بـا تـنش خشـکی بـا القـای انـواع واکنش‌هـای فیزیولـوژیکی، بیوشـیمیایی و مورفولوژیـک دارند. چندین عامل و سازکار به صورت مجزا و یا ترکیبی عمل مـی‌کننـد تـا گیاهـان را قـادر بـه سازگاری و تحمل تنش خشکی کنند.

سازکارهای گیاهان برای سازگاری بـا تـنش به سه دسته تقسیم می شوند: اجتنـاب از خشـکی (Drought avoidance)، تحمـل بـه خشـکی (Drought tolerance) و فـرار از خشـکی (Drought escape). اجتناب از خشکی با حفظ پتانسیل آب نسبتاً بالای بافـت بـا وجـود کمبـود رطوبت خـاک از طریـق افـزایش جـذب آب و کاهش آب تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تحمـل بـه خشکی بـه عنـوان توانـایی گیـاه بـرای زنـدگی، رشد و عملکرد رضـایت بخـش بـا آب محـدود خـاک بـا تـامین تنظـیم اسـمزی، ظرفیـت آنتـی اکسـیدانی و تحمـل خشـکی تعریـف می‌شود. فرار از خشـکی از طریـق یـک چرخـه زندگی کوتاه، بلوغ زودرس یـا تکمیـل مراحـل رشدی قبل از وقوع تنش خشـکی رخ مـی‌دهـد (Keshavarz and Moghadam, 2017).

محصـولات باغبـانی در برابـر تـنش خشـکی بسیار آسیب‌پذیر هستد. این گیاهان در مواجه بـا شرایط کم آبـی بـا مشـکلات نـامطلوب زیـادی روبرو می‌شوند که منجر به تغییـرات در سـطوح فیزیکوشیمیایی و مولکولی آن‌ها مـی‌شـود و در

نهایت رشد و عملکرد این گیاهان مختل می‌شود (Keshavarz and Moghadam, 2017). تنش خشکی سرعت پیری برگ را تسریع می‌کند و غلظت کلروفیل را کاهش می‌دهد و پروتئین‌های موجود در کلروفیل را تخریب کرده و سرانجام میزان فتوسنتز به میزان معنی‌داری کاهش می‌دهد در نتیجه عملکرد محصول کاهش می‌یابد (Liang *et al*., 2019).

از آنجا که سیستم‌های دفاعی طبیعی گیاه قادر به حفاظت کافی در شرایط تنش شدید نیستند، استفاده از محرک‌های زیستی مانند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه (Plant Growth Regulation) یک روش سازگار با محیط زیست و ایمن برای افزایش تحمل گیاهان محسوب می‌شود. در سال ای اخیر، ملاتونین به عنوان یک فراورده زیستی محافظتی چند منظوره در بهبود تنش‌های غیرزیستی و زیستی گیاهان معرفی شده است (Liu *et al*., 2020; Tiwari *et al*., 2020). ملاتونین دارای ساختار حلقه ایندولی، وزن مولکولی کم و یک مولکول پلئوتروپیک تکاملی است که در طیف وسیعی از موجودات زنده وجود دارد. ملاتونین دارای ویژگی‌های آموفیفیلیک با آمفیپاتیک است که به این مولکول اجازه می‌دهد به راحتی از غشای سلولی عبور کرده و به داخل سیتوزول، هسته و میتوکندری حرکت کند (Debnath *et al*., 2019). ملاتونین یک تنظیم‌کننده کلیدی است که به عنوان تعدیل‌کننده بالقوه در رشد و نمو گیاه عمل می‌کند.

در شرایط تنش خشکی تغییرات مورفولوژیک مختلفی در گیاه به منظور افزایش تحمل ایجاد می‌شود (Sun *et al*., 2021). ملاتونین با تعدیل فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی شرایط بیولوژی گیاهان را در مواجهه با تنش خشکی تنظیم می‌کند و در نهایت تحمل گیاهان را در برابر شرایط تنش خشکی افزایش می‌دهد (Cui *et al*., 2017). تنظیم دستگاه فتوسنتزی و سیستم دفاعی آنتی اکسیداتیو فرآیندهای اصلی فیزیولوژیکی هستند که توسط ملاتونین تحت شرایط کمبود آب کنترل می‌شوند (Liang *et al*., 2019). در دانهال‌های کیوی، تنش خشکی به طور قابل توجهی تولید زیست توده را کاهش و اختلال در غشای سلولی را افزایش داد و باعث بهبود فتوسنتز گردید (Liang *et al*., 2019). همچنین ملاتونین برون‌زا موجب کاهش آثار سوء تنش خشکی از طریق بهبود رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاهان در معرض تنش خشکی شد. گزارش شده است که ملاتونین با تنظیم گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان تحت تنش خشکی، پیری را به تأخیر می‌اندازد و به حفظ رشد گیاه در شرایط نامساعد تنش کمک می‌کند (Debnath *et al*., 2019).

هدف از انجام این پژوهش بررسی کارایی استعمال خارجی ملاتونین به منظور کاهش آثار

سوء تنش خشکی بر روی دو پایه تجاری گلابی(پایه بذری درگزی و پایه رویشی پیرودوارف) در شرایط گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

نهال های یکساله گواهی شده پایه‌های گلابی پیوند نشده بذری (درگزی) و پایه رویشی (پیرودوارف) با ارتفاع (۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر) از یک نهالستان تجاری در حوالی تهران در اوایل اسفندماه ۱۳۹۶ خریداری شد و به گلخانه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس، تهران منتقل شدند. ابتدا پایه‌ها با قارچ‌کش بنومیل سه در هزار ضدعفونی شدند سپس به گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد (۳۸ × ۲۸ سانتی‌متر) که با مخلوط خاک باغچه، ماسه و خاکبرگ به نسبت ۱:۱:۱ پر شده بودند منتقل شدند. شرایط محیطی گلخانه با دمای ۳۵/۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز/ شب و رطوبت ۴۵/۶۰ درصد تنظیم شد و به پایه‌ها اجازه داده شد تا به رشد مطلوب برسند.

پس از یک سال رشد مطلوب و استقرار کامل گیاهان در سال ۱۳۹۷ از بین پایه‌های رشد یافته، پایه‌هایی را که از نظر قدرت رشد (ارتفاع و قطر تنه) مشابه و متناسب بودند برای اعمال تنش خشکی انتخاب شدند. ابتدا نیمی از گیاهان هر پایه را انتخاب و با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تیمار شدند و نیمی را بدون اعمال ملاتونین به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. ملاتونین قبل از اعمال تنش خشکی به مدت ۱۰ روز (یک بار در روز) با آب آبیاری پای گیاه اعمال شد. پس از پیش تیمار ملاتونین تنش خشکی بصورت نگهداشت آب آبیاری (Withholding Irrigation Water) به مدت ۴۰ روز اعمال شد. به‌طوری‌که ابتدا بعد از اندازه‌گیری ظرفیت زراعی گلدان‌ها، تمامی گلدان‌ها به‌طور کامل آبیاری شدند. سپس نیمی از گلدان‌ها تحت تنش خشکی قرار داده شدند و نیمی دیگر بدون هیچ‌گونه تنشی به‌عنوان شاهد آبیاری می‌شدند.

در هر واحد آزمایشی چهار گیاه وجود داشت. مجموعا تعداد ۹۶ گیاه (که در واقع ۴۸ پایه بذری درگزی و ۴۸ پایه رویشی پیرودوارف) بود. گیاهان آزمایشی مربوط به هر دو پایه مورد مطالعه در چهار گروه قرار گرفتند: ۱- گیاهان با آبیاری معمولی به عنوان شاهد (کنترل)، ۲- گیاهان تحت تنش خشکی بدون کاربرد ملاتونین ۳- گیاهان تیمار شده با ملاتونین و به دنبال آن اعمال آبیاری معمولی و ۴- گیاهان تیمار شده با ملاتونین به دنبال آن اعمال تنش خشکی قرار گرفتند.

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به مدت یک سال در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس در تهران انجام شد. عوامل آزمایشی شامل: پایه در دوسطح (پایه بذری درگزی و پایه رویشی پیرودوارف)، ملاتونین در دوسطح (بدون ملاتونین و غلظت ۱۰۰ میکرو مولار ملاتونین)، تنش خشکی در دوسطح (آبیاری هر

۱۰ روز یکبار و قطع آبیاری به مدت ۴۰ روز) و طول دوره (زمان) تنش خشکی در چهار سطح (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از اعمال تنش خشکی).

اندازه گیری محتوای کلروفیل و کارتنوئید برگ

مقدار کلروفیل کل و کارتنوئیدها با استفاده از روش وارن (Warren, 2008) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۵۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ با استفاده از متانول ۸۰٪ عصاره‌گیری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر عصاره را در داخل هر چاهک میکروپلیت ۹۶ ریخته و در دو طول موج ۶۵۲ و ۶۶۵ نانومتر و کارتنوئید در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. متانول ۸۰ درصد به عنوان بلانک در نظر گرفته شد.

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II

پس از گذشت ۱۰ روز از اعمال تنش خشکی، اندازه‌گیری شاخص‌های کلروفیل فلورسانس ازمحل میانه برگ و بین رگبرگ اصلی و لبه آخرین برگ توسعه یافته هر گیاه با استفاده از دستگاه فلوریمترمدل (PAM 250 WALZ) صورت گرفت. بدین منظور، برگ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند، با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری فلورسانس، نور قرمز به برگ تابانده شد و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) اندازه‌گیری شد.

شاخص پایداری غشای سلولی

شاخص پایداری غشای سلولی براساس روش عزیزپور و همکاران (Azizpour *et al*., 2010) اندازه‌گیری شد. برای این منظور با استفاده از تعداد ۲۰ دیسک برگی با قطر یک سانتی‌مترتهیه و با آب مقطر شسته شدند تا الکترولیت‌های چسبیده به سطح آن‌ها شسته شود سپس برای تعیین شاخص پایداری غشای سلولی از رابطه زیر استفاده شد.

$$MSI = [1-(C_1/C_2)] \times 10$$

اندازه‌گیری میزان فنل کل گیاه

میزان فنل کل براساس روش اینسورث و گیلسپی (Ainsworth and Gillespie, 2007) محاسبه شد. در نهایت ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم به آن اضافه کرده و به مدت دو ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد. پس از گذشت دو ساعت ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش برداشته و داخل چاهک ۹۶ میکروپلیت ریخته و در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری سدیم ، پتاسیم و فسفر

اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم به روش نشر شعله ای به وسیله‌ی فیلم‌فتومتر اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه گیری فسفر از روش مولیبدات و وانادات با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر انجام شد (Tandon *et al*., 1968). یون‌های اورتوفسفات در محیط اسیدی با محلول مولیبدات وانادات کمپلکس زرد رنگ تولید می‌کند.

تجزیه وارایانس داده ها بر اساس موازاین

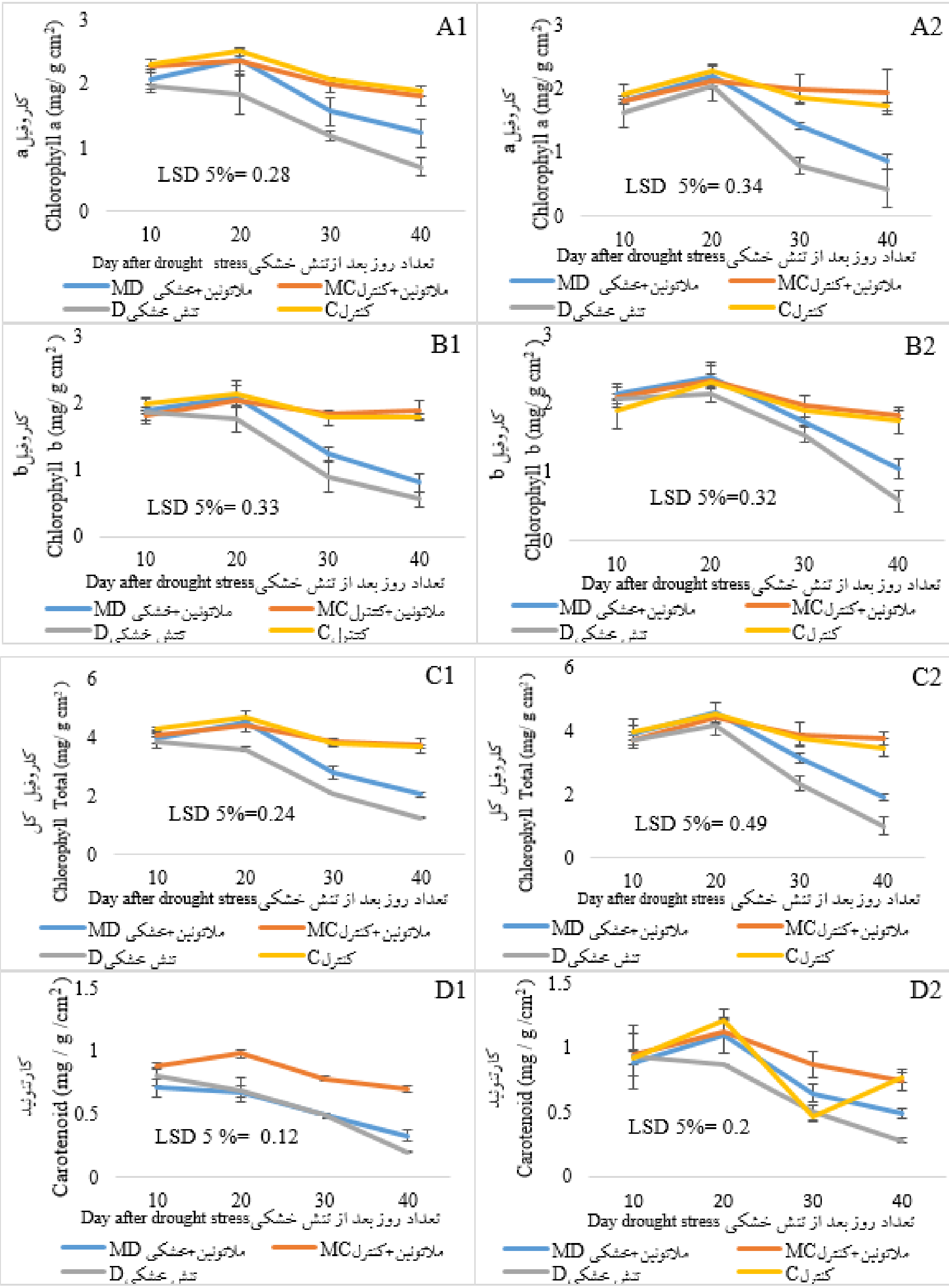
آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام شد. میانگین ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تجزیه وارایانس داده ها نشادن داد که اثر پایه، تنش خشکی، ملاتونین و اثر متقابل آنها بر محتوای کلررفیل و حداکثر کارآیی کوانتومی فتوسیستم II در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد معنی دار بود (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). مقایسه میانگین ها نشان داد که محتوای کلروفیل کل در برگ‌های دو پایه که تحت تنش خشکی قرار گرفتند پس از ۲۰ روز در مقایسه با گروه شاهد بدون تغییر باقی ماند (شکل ۱) نتایج نشان داد که غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل t و کارتنوئیدها به طور قابل توجهی در هر دو پایه از روز ۲۰ تا روز ۴۰ در مقایسه با گیاهانی که آبیاری شده بودند، کاهش یافت. با این وجود، کاربرد خارجی ملاتونین باعث محافظت قابل توجهی از رنگدانه‌ها در مقایسه با تیمار بدون ملاتونین شد. نقش محافظتی ملاتونین در محتوای کلروفیل b و کاروتنوئیدها در پایه‌های پیرودوارف به طور قابل توجهی بیشتر از پایه بذری درگزی بود (شکل ۱).

مقایسه میانگین های مربوط به پارامتر حداکثرکارایی فتوسیستم II (F_v/F_m) نشان داد که با افزایش دوره تنش خشکی میزان فلورسانس برگ در هر دو پایه در تیمارهای خشکی، خشکی × ملاتونین در مقایسه با شاهد بطور معنی‌داری کاهش یافت. اما استعمال ملاتونین خارجی باعث شد میزان فلورسانس برگ در مقایسه با تیمار خشکی به طور معنی‌دار بیشتر باشد (شکل ۲). گزارش شده است که تنش خشکی باعث تسریع پیری برگ می‌شود و غلظت کلروفیل را کاهش می‌دهد و پروتئین‌های موجود در کلروفیل را تخریب کرده و سرانجام میزان فتوسنتز به میزان معنی‌داری کاهش یافته و در نتیجه عملکرد محصول کاهش می‌یابد (Sharma *et al*., 2020).

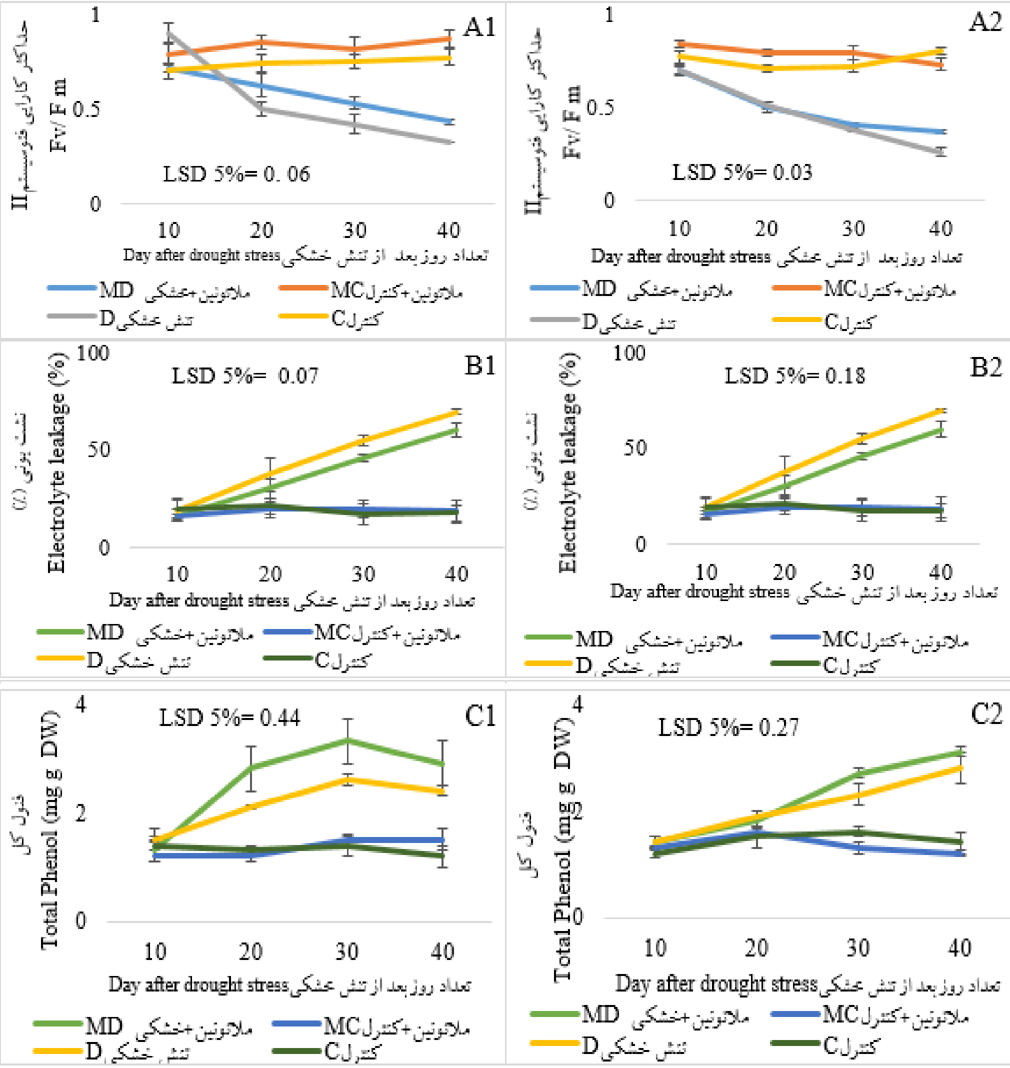
در شرایط تنش خشکی، ملاتونین با حفظ کارایی فتوسنتز، جلوگیری از تخریب کلروفیل، کاهش تعرق و همچنین هدایت روزنه‌ای آثار مخرب تنش در سیب را کاهش داد (Li *et al*., 2015). استفاده از ملاتونین در گیاه (*Carya cathayensis*) به طور قابل توجهی موجب کاهش تجزیه کلروفیل توسط آنزیم‌هایی مانند کلروفیلاز (Chlorophyllases)، پراکسیداز (Peroxidases) و فئوفیتیناز (Pheophytinases) و حفظ محتوای کلروفیل شد. همچنین گزارش شده است که افزایش میزان فتوسنتز توسط ملاتونین با بهبود قابلیت فتوشیمیایی (Fv/Fm) فتوسیستم II همراه با سرعت انتقال الکترون فتوسنتزی بهتر همراه بود (Sharma *et al*., 2020).



شکل ۱- اثر استعمال خارجی ملاتونین بر محتوی رنگدانه های فوتسنتزی در دو پایه گلابی بـذری درگـزی (۱) و رویشی پیرودوارف (۲) در شرایط شاهد و تنش خشکی. کلروفیل a (A) ، کلروفیـل b (B)، کلروفیـل کل (C)، کاروتنوئید (D). خطوط عمودی میانگین ± انحراف معیار در سه تکرار ارائه شده است.

Fig. 1. Effect of exogenous melatonin on contents of photosynthetic pigments in two pear rootstocks: Dargazi seedling (1) and Pyrodwarf clonal (2) under control and drought stress conditions. Chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), total chlorophyll (C), Carotenoid (D). Vertical lines represent mean ± SD of three replications.

M: Melatonin, D: Drought Stress, C: Control, MD: Melatonin + Drought, MC: Melatonin + Control



شکل ۲- اثر تنش خشکی و ملاتونین بر فلورسانس کلروفیل (A)، پایداری غشاء (B) و فنل کل (C) در دو پایه بذری درگزی(۱) و رویشی پیرودوارف (۲). خطوط عمودی میانگین ± انحراف معیار در سه تکرار ارائه شده است.

Fig. 2. Effect of drought stress and 100 µM melatonin on Fv/Fm (A), Electrolyte leakage (B), and Total phenol (C) in two rootstocks pear Dargazi seedling (1) and Pyrodwarf clonal (2). Vertical lines represent mean ± SD of three replications.
M: Melatonin, D: Drought Stress, C: Control, MD: Melatonin + Drought, MC: Melatonin + Control

در پژوهش حاضر، تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر پایه، خشکی، ملاتونین و زمان بر شاخص نشت الکترولیتی، که نشان دهنده پایداری غشای سلولی است، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل پایه × زمان، خشکی × زمان و ملاتونین × زمان اثر معنی‌داری بر پایداری غشای سلولی داشتند (جدول ۱). تنش شدید خشکی نشت یونی را در هر دو پایه به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۲). مقایسه میانگین‌ها بین دو پایه تفاوت

معنی‌داری از نظر پایداری غشای سلولی نشان داد، به طوریکه میزان پایداری غشای سلولی پایه درگزی بیشتر از پایه پیرودوارف بود. با طولانی‌تر شدن دوره تنش خشکی میزان نشت یونی در هر دو پایه به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد.

جدول ۱- تجزیه واریانس برای اثر ملاتونین بر شاخص نشت الکترولیت و غلظت فنل کل در برگ دو پایه بذری و رویشی گلابی در شرایط تنش خشکی

Table 1. Analysis of variance for effect of melatonin on electrolyte leakage index and total phenol content of the leaf of the two studied seedling and clonal pear rootstocks under drought stress conditions

S. O. V.	منبع تغییرات	درجه آزادی d. f.	شاخص نشت الکترولیت Electrolyte leakage index	فنل کل Total phenol
Block	بلوک	2	0.00	0.39*
Rootstock (R)	پایه	1	0.47**	0.10**
Drought stress (D)	تنش خشکی	1	1.41**	19.00**
Melatonin (M)	ملاتونین	1	0.04**	0.12*
R × D	تنش خشکی × پایه	1	0.01	0.33**
R × M	ملاتونین × پایه	1	0.01	0.01
D × M	ملاتونین × تنش خشکی	1	0.03	0.14*
R × D × M	ملاتونین × تنش خشکی × پایه	1	0.05*	0.10
Time	زمان	3	0.89**	2.80*
R × T	زمان × پایه	3	0.03**	0.11**
D × T	زمان × تنش خشکی	3	0.09*	2.20**
M × T	زمان × ملاتونین	3	0.01*	0.13
R × D × T	زمان × تنش خشکی × پایه	3	0.00	0.46**
R × M × T	زمان × ملاتونین × پایه	3	0.00	0.13
D × M × T	زمان × ملاتونین × تنش خشکی	3	0.01	0.24
R × D × M × T	زمان × ملاتونین × تنش خشکی × پایه	3	0.01	0.35
Error	اشتباه آزمایشی	48	0.05	0.02
C. V. (%)	ضریب تغییرات (٪)		9.70	8.30

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح پنج درصد و یک درصد.

* and **: Significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

پیش تیمار ملاتونین در هر دو پایه اثر مثبت و معنی‌داری بر پایداری غشای سلولی داشت و باعث کاهش نشت یونی و افزایش پایداری غشای سلولی شد (شکل ۲). تنش خشکی فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی مانند پایداری غشای سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. میزان یکپارچگی و پایداری در غشای سلول در شرایط تنش شدید خشکی با تحمل به تنش خشکی در ارتباط است. با این حال، این پارامترها به طور قابل توجهی با استفاده از ملاتونین بهبود یافت که به عنوان کاهش سطح علائم آسیب نیز منعکس شد. اثر مشابهی در برگ گوجه فرنگی مشاهده شد (Wang *et al*., 2020).

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر پایه، ملاتونین، خشکی و زمان و همچنین اثر متقابل پایه × خشکی × زمان بر میزان فنل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین ها نشان داد که پس از ۴۰ روز عدم آبیاری، میزان فنل کل در هر دو پایه به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. درصد افزایش تولید فنل کل در گیاهان تحت تنش خشکی شدید در مقایسه با شاهد در پایه های بذری درگزی و رویشی پیرودوارف به ترتیب ۱۲۳ و ۱۰۰ درصد بود. استعمال خارجی ملاتونین در پایه درگزی نشان داد که میزان فنل کل بیشتری در مقایسه با گیاهان تحت تنش خشکی تولید شد و تفاوت معنی‌داری بین میزان فنل این دو تیمار وجود داشت (شکل ۲).

ترکیبات فنلی، جذب‌کننده‌های عالی رادیکال‌های فعال اکسیژن هستند، زیرا پتانسیل کاهش الکترون رادیکال‌های فنلی کمتر از پتانسیل کاهش الکترون رادیکال‌های فعال اکسیژن است و همچنین به این دلیل که رادیکال‌های فنوکسیل به طور کلی واکنش‌پذیری کمتری نسبت به رادیکال‌های فعال اکسیژن دارند. بنابراین، ترکیبات فنلی می‌توانند واسطه‌های اکسیژن فعال را بدون ایجاد واکنش‌های اکسیداتیو بیشتر از بین ببرند. نتیجه این است که بسیاری از تنش‌های محیطی که باعث تنش اکسیداتیو می‌شوند، اغلب باعث سنتز متابولیت های فنلی می‌شوند (Debnath *et al*., 2019).

تجزیه واریانس داده ها نشان داد اثر عوامل آزمایشی و برخی آثار متقابل آنها بر غلظت سدیم برگ در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی دار بود (جدول ۲). همچنین اثر پایه، خشکی، ملاتونین و زمان بر سدیم ریشه در سطح درصد احتمال یک و پنج معنی‌دار شد. علاوه براین اثر متقابل سه گانه پایه × خشکی× ملاتونین و پایه × ملاتونین × زمان بر سدیم ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با طولانی‌تر شدن مدت زمان تنش خشکی میزان سدیم برگ در هر دو پایه یک روند افزایشی را داشت (جدول ۳). بیشترین و کمترین میزان این عنصر در برگ بترتیب در تیمار تنش خشکی و شاهد مشاهده شد. میزان سدیم برگ در تیمار ملاتونین× تنش خشکی در مقایسه با تنش خشکی به طور معنی‌داری در هر دو پایه کمتر بود. مقایسه میانگین ها نشان داد با افزایش دوره تنش خشکی میزان سدیم در ریشه هر دو پایه بذری درگزی و رویشی پیرودوارف یک روند افزایشی داشت (جدول ۳). میزان تجمع سدیم ریشه در پایه پیرودوارف به طور معنی‌داری بیشتر از پایه درگزی بود. بیشترین میزان تجمع سدیم در ریشه در تیمار تنش خشکی پایه پیرودوارف مشاهده شد. استعمال خارجی ملاتونین در هر دو پایه، میزان تجمع سدیم در ریشه را در مقایسه با تیمار خشکی به طور معنی‌داری کاهش داد (جدول ۴).

تجزیه واریانس داده نشان داد که اثر عوامل

آزمایشی و اغلب آثار متقابل آنها بر غلظت پتاسیم برگ در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌داربود (جدول ۲). مقایسه میانگین ها نشان داد که میزان پتاسیم در برگ پایه بذری درگزی به طور معنی‌داری بیشتر از پایه پیرودوارف بود (جدول ۳). همچنین تجزیه واریانس داده ها نشان داد اثر پایه، تنش خشکی، ملاتونین، زمان تنش و اثر متقابل دو گانه پایه × تنش خشکی و تنش خشکی × زمان بر غلظت پتاسیم ریشه در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین ها نشان داد که با طولانی تر شدن دوره تنش خشکی میزان پتاسیم برگ در پایه بذری درگزی در تیمار تنش خشکی × ملاتونین در مقایسه با سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشت. در پایه رویشی پیرودوارف همین روند مشاهده شد، اما بین تیمار کاربرد ملاتونین× تنش خشکی در مقایسه با تیمار تنش خشکی تفاوت معنی‌دار نبود.

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر پایه، ملاتونین، تنش خشکی و زمان تنش و اثرات متقابل خشکی× ملاتونین، پایه × خشکی، خشکی× زمان، پایه×خشکی× زمان و زمان × خشکی× ملاتونین بر غلظت فسفر در برگ و ریشه در سطح احتمال یک درضد معنی دار بود (جدول۲). بررسی و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش دوره تنش خشکی غلظت فسفر برگ در پایه‌های مورد بررسی از یک روند کاهشی برخوردار بود (جدول ۴). بیشترین و کمترین غلظت فسفر برگ به ترتیب متعلق به تیمار شاهد و تنش خشکی بود. میزان فسفر برگ درپایه درگزی به طور معنی‌داری بیشتر از پایه پیرودوارف بود (جدول ۴). میزان فسفر برگ در تیمار ملاتونین× تنش خشکی در مقایسه با تیمار تنش خشکی بیشتر بود و تفاوت بین این دو تیمار معنی‌دار بود (جدول ۴).

تامین آب به عنوان یک متغیر در تولید محصولات کشاورزی بسیار حیاتی است، زیرا جذب مواد مغذی را تسهیل می کند و تنش خشکی می‌تواند با کاهش جذب، انتقال و توزیع مجدد عناصر غذایی از رشد گیاه جلوگیری کند (Sardans and Penuelas, 2012). داده های این پژوهش حاصر نیز نشان داد که تنش خشکی به طور قابل توجهی جذب عناصر غذایی را توسط پایه‌های مورد بررسی را کاهش داد. با توجه به اینکه جذب فسفر از طریق انتشار می‌باشد بنابراین تنش خشکی با ایجاد اختلال در این فرایند باعث کاهش شدید جذب این عنصر می شود.

در هنگام تنش خشکی جذب پتاسیم در برگ افزایش می‌یابد که این می‌تواند به دلیل سازکار جذب فعال این یون باشد. یکی از دلایل احتمالی حفظ غلظت پتاسیم در برگ‌ها سرعت بالای انتقال آن از ریشه به اندام هوایی می‌باشد . عنصر پتاسیم هم در تنظیم روابط آب در گیاه و هم در تنظیم اسمزی نقش بسزایی دارد. در اینپژوهش، داده‌های ما نشان داد که جذب عناصرفسفر، پتاسیم و سدیم به‌طور قابل‌توجهی بر اثر تنش خشکی کاهش یافت، اما

جدول ۲- تجزیه واریانس برای اثر ملاتونین بر غلظت عناصر سدیم، پتاسیم و فسفر در برگ و ریشه دو پایه بذری و رویشی گلابی در شرایط تنش خشکی

Table 2. Analysis of variance for the effect of melatonin on Na, K, and P contens of the leaf and root of the two studied i seedling and clonal pear rootstocks under drought stress conditions

S. O. V.	منبع تغییرات	درجه آزادی d.f.	سدیم (برگ) Na (leaf)	سدیم (ریشه) Na (root)	پتاسیم (برگ) K (leaf)	پتاسیم (ریشه) K (root)	فسفر (برگ) P (leaf)	فسفر (ریشه) P (root)
Block	بلوک	2	6.9	28.9	144.00*	10.40	2.10	6.7
Rootstock (R)	پایه	1	364.6**	816.6**	1395.00**	8.10	100.00**	70.0**
Drought stress (D)	تنش خشکی	1	4041.7**	1480.0**	3128.00**	2072.00**	1453.00**	7141.0**
Melatonin (M)	ملاتونین	1	87.2**	140.1*	126.00**	15.00	43.32**	176.0**
R × D	تنش خشکی × پایه	1	224.0**	620**	425.00**	70.00*	32.34**	92.0**
R × M	ملاتونین × پایه	1	20.0*	28.1	308.00**	2.00	9.37	24.0
D × M	ملاتونین × تنش خشکی	1	81.0**	192.6	126.00**	32.60	187.00**	84.0**
R × D × M	ملاتونین × تنش خشکی × پایه	1	19.0*	6.0**	294.00**	0.16	84.00*	28.1
Time	زمان	3	730.0*	2507.0**	1184.00*	520.00	1858.00*	876.0**
R × T	زمان × پایه	3	23.5*	27.0	79.40**	30.40	46.80**	21.6
D × T	زمان × تنش خشکی	3	706.9	1958.0**	825.90**	490.00**	2059.00**	669.4**
M × T	زمان × ملاتونین	3	7.2	13.2	13.40	4.70	14.60	5.6
R × D × T	زمان × تنش خشکی × پایه	3	27.8**	123.7**	140.00**	1.90	72.40**	9.0
R × M × T	زمان × ملاتونین × پایه	3	0.70	5.5	28.10	2.10	12.20	11.0
D × M × T	زمان × ملاتونین × تنش خشکی	3	7.6	136.5**	25.29	10.30	88.00**	5.8
R × D × M × T	زمان × ملاتونین × تنش خشکی × پایه	3	0.2	13.2	40.90	3.50	3.7.00	4.2
Error	اشتباه آزمایشی	48	4.0	19.6	14.20	15.60	15.00	9.0
C. V. (%)	ضریب تغییرات (٪)		17.6	13.3	3.7	19	7.5	10.0

* and **: Significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

* و ** : به ترتیب معنی دار در سطح پنج درصد و یک درصد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر خشکی و ملاتونین برغلظت سدیم ، پتاسیم و فسفر برگ دو پایه بذری درگزی و رویشی پیرودوارف

Table 2. Mean comparison of drought stress and melatonin application effect on Na, K, and P contents in the leaf of Dargazi seedling and Pyrodwarf clonal rootstocks

		سدیم Na (mg g^{-1} dry weight)				پتاسیم K (mg g^{-1} dry weight)				فسفر P (mg g^{-1} dry weight)			
	روز پس از اعمال تنش خشکی DAT	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
		Dargazi seedling rootstock پایه بذری درگزی											
Control (C)	شاهد	2.2	3.4	2.0	3.8	21.0	9	14	19.0	64.0	65.6	69.0	66.0
Drought stress (D)	تنش خشکی	2.8	17.0	28.0	39.0	14.0	10	29	40.0	61.0	47.0	34.0	17.0
M + C	ملاتونین + شاهد	2.4	4.2	3.6	3.9	22.0	20	16	15.5	72.3	72.3	70.0	66.0
M + D	ملاتونین + تنش خشکی	3.5	11.4	21.9	31.0	16.0	28	37	59.0	62.3	50.3	40.6	28.3
LSD 5%		1.2	2.0	4.2	7.0	3.3	4.2	15.3	8.3	8.5	8.2	8.8	7.7
		Pyrodwarf clonal rootstock پایه رویشی پیرودوارف											
Control (C)	شاهد	2.2	3.0	2.3	3.8	7.3	13	12	17.0	56.3	67.3	65.0	69.0
Drought stress (D)	تنش خشکی	3.0	17.0	28.0	39.0	9.3	17	25	34.0	50.0	30.0	15.0	4.0
M + C	ملاتونین + شاهد	2.4	4.2	3.6	4.0	8.0	12	13	15.0	64.0	73.0	61.0	65.0
M + D	ملاتونین + تنش خشکی	3.5	11.0	22.0	31.0	7.3	14	22	30.0	57.0	43.0	27.0	14.0
LSD 5%		4.1	5.7	5.2	4.2	4.6	3.7	7.1	11.0	9.3	5.7	9.8	7.1

DAT: Day after drought stress applied.

"مجله نهال و بذر" جلد ۳۷، شماره ۴، سال ۱۴۰۰

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر خشکی و ملاتونین برغلظت سدیم ، پتاسیم و فسفر ریشه دو پایه بذری درگزی و رویشی پیرودوارف

Table 4. Mean comparison of drought and melatonin application on effect the concentration of Na, K, and P in the root of Dargazi seedling and Pyrodwarf clonal rootstocks

		سدیم Na (mg g^{-1} dry weight)				پتاسیم K (mg g^{-1} dry weight)				فسفر P (mg g^{-1} dry weight)			
روز پس از اعمال تنش خشکی DAT		10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
		Dargazi seedling rootstock پایه بذری درگزی											
Control (C)	شاهد	20	19.0	20	20	23	23	26	25	39.0	36.6	48.6	37.5
Drought stress (D)	تنش خشکی	23	34.0	47	63	25	18	11	6	38.0	20.0	14.6	7.0
M + C	ملاتونین + شاهد	16	18.0	25	24	26	23	24	24	36.0	29.3	39.3	38.0
M + D	ملاتونین +تنش خشکی	22	30.4	45	55	27	20	15	9	38.0	28.3	20.6	18.6
LSD 5%		12.5	8.1	6.6	8.3	9.3	9.3	6.9	2.8	6.0	4.9	4.2	8.1
		Pyrodwarf clonal rootstock پایه رویشی پیرودوارف											
Control (C)	شاهد	27	20.0	18	19	26	27	25	24	38.0	41.3	35.6	37.0
Drought stress (D)	تنش خشکی	25	43.0	66	82	16	16	9	2	33.0	21.0	13.3	5.0
M + C	ملاتونین + شاهد	17	22.0	22	25	27	27	22	25	40.0	41.0	37.0	38.0
M + D	ملاتونین + تنش خشکی	24	41.0	57	69	27	17	11	4	36.4	23.0	14.0	8.0
LSD 5%		8.2	9.4	10.2	5.5	5.9	8.1	6.8	6.5	4.0	3.5	7.4	3.1

زمانی که استعمال خارجی ملاتونین بخشی از تیمار بود، کمک به جذب بیشتر این عناصر کرد. ملاتونین تأثیر تعدیل کننده مهمی بر ترکیب عناصر معدنی گیاهان دارد و با کمک به تنظیم آن عناصر، آثار سوء تنش خشکی را کاهش می‌دهد. به عنوان مثال، مکمل ملاتونین بر روی سیب در شرایط تنش خشکی شدید نشان داد که ملاتونین کمک به جذب بیشتر این عناصر کرد و در نهایت باعث ایجاد تحمل به تنش خشکی در گیاه شد (Liang *et al.*, 2018) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

نتیجه گیری

ملاتونین یک تنظیم‌کننده کلیدی است که به عنوان تعدیل‌کننده بالقوه در رشد و نمو گیاه عمل می‌کند. ملاتونین با تعدیل فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی شرایط بیولوژی گیاهان را تنظیم می‌کند و در نهایت تحمل آنها را در برابر شرایط تنش خشکی افزایش می‌دهد. نتایج این پژوهش بر روی دو پایه بذری درگزی و رویشی پیرودوارف گلابی نشان داد که استفاده از ملاتونین در شرایط تنش خشکی منجر به کاهش تخریب کلروفیل و تاخیر در پیری برگ از طریق سازکارهای مهارگونه های فعال اکسیژن شد. دلیل اصلی بهبود فتوسنتز با استفاده ملاتونین درشرایط تنش خشکی این است که ملاتونین از ساختار کلروپلاست در برگ‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند.

نتایج این پژوهش نشان داد که پیش تیمار ملاتونین تأثیر نامطلوب تنش خشکی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پایه های بذری درگزی و رویشی پیرودوارف گلابی را کاهش داد و منجر به افزایش تحمل این پایه ها به تنش خشکی شد. تفاوت های قابل توجهی بین پایه های بذر درگزی و رویشی پیرودوارف گلابی در واکنش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به تنش خشکی مشاهده شد. پایه بذری درگزی عمدتاً به دلیل سطح برگ، کارایی فتوسنتزی، محتوای کلروفیل و پایداری غشای سلولی بیشتر در برابر تنش خشکی متحمل تر بود. همچنین پایه بذری درگزی نشان داد که از سیستم آنتی اکسیدانی قوی‌تر برخوردار بود به طوریکه میزان فنل کل بیشتری در مقایسه با پایه رویشی پیرودوارف داشت. یافته‌های آزمایش حاضر نقش ملاتونین را در تنظیم آنتی اکسیدان آنزیمی و بهبود رشد پایه بذری درگزی برجسته می‌کند. تحمل بیشتر به تنش خشکی این پایه را به عنوان یک پایه مناسب و سازگار برای کشت در مناطق خشک و نیمه خشک ایران تبدیل کرده است. با این حال، پژوهش های تکمیلی بیشتری برای بررسی ارتباط احتمالی بین روش های کاربردهای ملاتونین و سطوح مختلف تنش خشکی مورد نیاز است.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از رساله دکتری نگارنده

اول می باشد که در آزمایشگاه درختان میوه (پومولوژی) گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس در تهران انجام شده است. نگارندگان

بدینوسیله از حمایت های به عمل آمده و همکاری های انجام شده برای اجرای این پژوهش سپاسگزاری می کنند.

References

Adnan, M. 2020. Application of selenium a useful way to mitigate drought stress: a review. Journal of Biological Science and Research 3 (1): 22-31.

Ahmadi, K., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Hoseinpour, R., and Abdshah, H. 2020. Statistical Yearbook of Agriculture: Volume 3: Horticultural Products. Information Technology and Communication Center, Deputy of Planning and Economy, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 164 pp. (in Persian).

Ainsworth, E. A., and Gillespie, K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols 2 (4): 875-877.

Arzani, K. 2017. The potential and limiting environmental conditions on fruit trees germplasm and yield of established orchards in Iran. pp. 110. In: Proceedings of First International Horticultural Science Conference of Iran, September 4-7, Tarbiat Modares University. Tehran, Iran.

Azizpour, K., Shakiba, M. R., Khosh Kholgh Sima, N., Alyari, H., Moghaddam, M., Esfandiari, E., and Pessarakli, M. 2010. Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. Journal of Plant Nutrition 33: 859-873.

Campos, C. N., Ávila, R. G., De souza, K. R. D., Azevedo, L. M., and Alves, J. D. 2019. Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants. Agricultural Water Management 211: 37-47.

Cui, G., Zhao, X., Liu, S., Sun, F., Zhang, C., and Xi, Y. 2017. Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. Plant Physiology and Biochemistry 118: 138-149 .

Debnath, B., Islam, W., Li, M., Sun, Y., Lu, X., Mitra, S., and Qiu, D. 2019. Melatonin mediates enhancement of stress tolerance in plants. International journal of Molecular Sciences 20 (5): 1040-1051.

FAO. 2020. Food and Agricultural Organization Statistics Yearbook. Publication of Food and Agricultural Organization, Rome, Italy.

Keshavarz, H., and Moghadam, R. S. G. 2017. Seed priming with cobalamin (vitamin B12) provides significant protection against salinity stress in the common bean. Rhizosphere 3: 143-149.

Liang, B., Ma, C., Zhang, Z., Wei, Z., Gao, T., Zhao, Q., and Li, C. 2018. Long-term exogenous application of melatonin improves nutrient uptake fluxes in apple plants under moderate drought stress. Environmental and Experimental Botany 155: 650-661.

Liang, D., Ni, Z., Xia, H., Xie, Y., Lv, X., Wang, J., and Luo, X. 2019. Exogenous melatonin promotes biomass accumulation and photosynthesis of kiwifruit seedlings under drought stress. Scientia Horticulturae 246: 34-43.

Liu, Z., Li, H., Gou, Z., Zhang, Y., Wang, X., Ren, H., and Yu, L. 2020. Genome-wide association study of soybean seed germination under drought stress. Molecular Genetics and Genomics 295 (3): 661-673 .

Musacchi, S. 2018. Physiological basis of pear pruning and light effects on fruit quality. Acta Horticulture 1303: 151-162.

Sardans, J., and Penuelas, J. 2012. The role of plants in the effects of global change on nutrient availability and stoichiometry in the plant-soil system. Plant Physiol 160: 1741-1761.

Sharma, A., Wang, J., Xu, D., Tao, S., Chong, S., Yan, D., and Zheng, B. 2020. Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in grafted *Carya cathayensis* plants. Science of the Total Enviroment 713: 136675. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136675.

Sun, C., Liu, L., Wang, L., Li, B., Jin, C., and Lin, X. 2021. Melatonin: A master regulator of plant development and stress responses. Journal of Integrative Plant Biology 63 (1): 126-145.

Tandon, H., Cescas, M., and Tyner, E. 1968. An acid-free vanadate-molybdate reagent for the determination of total phosphorus in soils. Soil Science Society of America Journal 32 (1): 48-51.

Tiwari, R. K., Lal, M. K., Naga, K. C., Kumar, R., Chourasia, K. N., Subhash, S., and Sharma, S. 2020. Emerging roles of melatonin in mitigating abiotic and biotic stresses of horticultural crops. Scientia Horticulturae 272: 109. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109592.

Wang, M., Zhang, S., and Ding, F. 2020. Melatonin mitigates chilling-induced

oxidative stress and photosynthesis inhibition in tomato plants. Antioxidan**ts** 9: 218. DOI: 10.3390/antiox9030218.

Warren, C. 2008. Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. Journal of Plant Nutrition 31 (7): 1321-1332.